

1 National Hospital Organization:

- 2 - Asahikawa Medical Center, Yakumo Hospital, Aomori National Hospital,
- 3 - Akita National Hospital, Nishitaga National Hospital, East Saitama National Hospital,
- 4 - Shimoshizu National Hospital, National Hakone Hospital, Niigata National Hospital,
- 5 - Iou National Hospital, Nagara Medical Center, Suzuka National Hospital,
- 6 - Nara Medical Center, Utano Hospital, Toneyama National Hospital,
- 7 - Hyogo-cyuo National Hospital, Hiroshima-Nishi Medical Center, Matsue Medical
- 8 Center,
- 9 - Tokushima National Hospital, Oomuta Hospital, Nagasaki Kawatana Medical Center,
- 10 - Kumamoto Saishunso National Hospital, Nishibeppu National Hospital,
- 11 - Miyazaki Higashi Hospital, Minami Kyushu National Hospital, Okinawa National
- 12 Hospital
- 13 - National Center of Neurology and Psychiatry

## 14 6. References

- 15 American Thoracic Society Documents (2004). Respiratory Care of the Patient with
- 16 Duchenne Muscular Dystrophy. ATS Consensus Statement · *American Journal of*
- 17 *Respiratory and Critical Care Medicine*, Vol 170, pp 456-465.
- 18 Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K,
- 19 McDonald C, Pandya S, Poysky J, Shapiro F, Tomezsko J, Constantin C, for the
- 20 DMD care considerations working group (2010a). Diagnosis and management of
- 21 Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and
- 22 psychosocial management. *The Lancet Neurology*, Vol.9, pp 77-93.
- 23 Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K,
- 24 McDonald C, Pandya S, Poysky J, Shapiro F, Tomezsko J, Constantin C, for the
- 25 DMD care considerations working group (2010b). Diagnosis and management of
- 26 Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care.
- 27 *The Lancet Neurology*, Vol.9, pp 177-189.
- 28 Ishikawa Y, Bach JR, Minami R (1999). Cardioprotection for Duchenne's muscular
- 29 dystrophy. *American Heart Journal* Vol.137, pp 895-902.
- 30 Ishikawa Y, Miura T, Ishikawa Y, Aoyagi T, Ogata H, Hamada S, Minami R (2011).
- 31 Duchenne muscular dystrophy: Survival by cardio-respiratory interventions.
- 32 *Neuromuscular Disorders* Vol. 21, pp 47-51.
- 33 Matsumura T, Tamura T, Kuru S, Kikuchi Y, Kawai M (2010) · Carvedilol can prevent
- 34 cardiac events in Duchenne muscular dystrophy. *Internal Medicine* Vol. 49, pp 1357-
- 35 1363.
- 36 Matsumura T, Saito T, Fujimura H, Shinno S, Sakoda S (2011). A longitudinal cause-of-
- 37 death analysis of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Rinsho-shinkeigaku*
- 38 in press.

- 
- 1 Tatara K, Shinno S (2008). Management of mechanical ventilation and prognosis in  
2 Duchenne muscular dystrophy. *IRYO*, Vol. 62, pp 566-571.

# A Loss-of-Function Mutation in the *SLC9A6* Gene Causes X-Linked Mental Retardation Resembling Angelman Syndrome

Yumi Takahashi,<sup>1</sup> Kana Hosoki,<sup>1</sup> Masafumi Matsushita,<sup>2</sup> Makoto Funatsuka,<sup>3</sup> Kayoko Saito,<sup>4</sup> Hiroshi Kanazawa,<sup>2</sup> Yu-ichi Goto,<sup>5</sup> and Shinji Saitoh<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Japan

<sup>2</sup>Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University, Osaka, Japan

<sup>3</sup>Department of Pediatrics, Tokyo Womens' Medical University, Tokyo, Japan

<sup>4</sup>Institute of Medical Genetics, Tokyo Womens' Medical University, Tokyo, Japan

<sup>5</sup>Department of Mental Retardation and Birth Defect Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo, Japan

Received 29 November 2010; Accepted 6 July 2011

*SLC9A6* mutations have been reported in families in whom X-linked mental retardation (XMR) mimics Angelman syndrome (AS). However, the relative importance of *SLC9A6* mutations in patients with an AS-like phenotype or XMR has not been fully investigated. Here, the involvement of *SLC9A6* mutations in 22 males initially suspected to have AS but found on genetic testing not to have AS (AS-like cohort), and 104 male patients with XMR (XMR cohort), was investigated. A novel *SLC9A6* mutation (c.441delG, p.S147fs) was identified in one patient in the AS-like cohort, but no mutation was identified in XMR cohort, suggesting mutations in *SLC9A6* are not a major cause of the AS-like phenotype or XMR. The patient with the *SLC9A6* mutation showed the typical AS phenotype, further demonstrating the similarity between patients with AS and those with *SLC9A6* mutations. To clarify the effect of the *SLC9A6* mutation, we performed RT-PCR and Western blot analysis on lymphoblastoid cells from the patient. Expression of the mutated transcript was significantly reduced, but was restored by cycloheximide treatment, indicating the presence of nonsense mediated mRNA decay. Western blot analysis demonstrated absence of the normal NHE6 protein encoded for by *SLC9A6*. Taken together, these findings indicate a loss-of-function mutation in *SLC9A6* caused the phenotype in our patient. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** *SLC9A6*; sodium/hydrogen exchanger 6; Angelman syndrome; X-linked mental retardation; nonsense mediated mRNA decay

## INTRODUCTION

*SLC9A6* mutations were first reported by Gilfillan et al. [2008] in families exhibiting an X-linked mental retardation (XMR) syndrome mimicking Angelman syndrome (AS). Angelman syndrome is characterized by severe developmental delay with absent or minimal speech, ataxia, easily provoked laughter, epilepsy, and

### How to Cite this Article:

Takahashi Y, Hosoki K, Matsushita M, Funatsuka M, Saito K, Kanazawa H, Goto Y-I, Saitoh S. 2011. A Loss-of-Function Mutation in the *SLC9A6* Gene Causes X-Linked Mental Retardation Resembling Angelman Syndrome.

Am J Med Genet Part B 156:799–807.

microcephaly. The syndrome is caused by loss-of-function of the *UBE3A* gene which is subject to genomic imprinting. Patients with *SLC9A6* mutations resemble patients with AS, but also demonstrate distinctive clinical features including cerebellar atrophy, slow progression of symptoms, increased glutamate/glutamic acid peak on magnetic resonance spectroscopy (MRS), and lack of characteristic abnormalities seen AS patients examined using electroencephalography (EEG). Following the first report in 2008, in 2010 Schroer et al. reported two other families with AS due to *SLC9A6* mutations, and confirmed the findings of Gilfillan et al.

The *SLC9A6* gene is located on Xq26.3, and encodes the ubiquitously expressed Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger protein member 6, NHE6. The NHE protein family consists of nine members and includes

Grant sponsor: Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan; Grant number: 21591306.

\*Correspondence to:

Shinji Saitoh, Department of Pediatrics, Hokkaido University Graduate School of Medicine, N-15, W-7, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan.

E-mail: ss11@med.hokudai.ac.jp

Published online 2 August 2011 in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com).

DOI 10.1002/ajmg.b.31221

NHE1-5 which is found in the plasma membrane, and NHE6-9 which is found in the membranes of intracellular organelles such as mitochondria and endosomes. NHE6 is predominantly present in the early recycling endosome membranes, and is believed to have a role in regulating luminal pH and monovalent cation concentration in intracellular organelles [Brett et al., 2002; Nakamura et al., 2005]. Moreover, Roxrud et al. demonstrated that NHE6 in combination with NHE9 participated in regulation of endosomal pH in HeLa cells by means of the procedure of co-depletion of NHE6 and NHE9 [Roxrud et al. 2009], indicating the significant role of NHE6 in fine-tuning of endosomal pH in human cells. In the brain, exocytosis from recycling endosomes is essential for the growth of dendritic spines which grow during long-term potentiation (LTP). In the absence of recycling endosomal transport, spines are rapidly lost, and LTP stimuli fail to elicit spine growth [Park et al., 2006]. Thus, NHE6 has an important role in the growth of dendritic spines, and also in the development of normal brain wiring. Thus far, five *SLC9A6* mutations have been reported in six AS families; two nonsense mutations, one inframe deletion, one frameshift deletion, and one splicing mutation [Gilfillan et al., 2008; Schroer et al., 2010]. The precise pathogenesis by which these mutations produce disease remains to be clarified.

The aim of this study was to clarify the incidence and importance of *SLC9A6* mutations in AS-like patients and patients with XMR, and to shed light on the molecular pathogenesis of disease due to *SLC9A6* mutations.

## MATERIALS AND METHODS

### Enrolled Patients

We examined 22 affected Japanese males clinically suspected of having AS but who lacked the genetic abnormalities reported in AS (AS-like cohort). These patients had AS excluded by having negative results for the *SNURF-SNRPN* DNA methylation test (which identifies a deletion, uniparental disomy, or imprinting defect) and *UBE3A* mutation screening (performed as described previously) [Saitoh et al., 2005]. We also examined DNA samples from 104 Japanese patients suspected of having XMR (XMR cohort). The XMR samples were collected as a part of a project for the Japanese Mental Retardation Consortium [Takano et al., 2008]. This study was approved by the Institutional Review Board of Hokkaido University Graduate School of Medicine, and written informed consent was obtained from the parents of the enrolled patients.

### Mutation Analysis of the *SLC9A6* Gene

We amplified each exon, including exon–intron boundaries, of the *SLC9A6* gene using polymerase chain reaction (PCR), and all amplicons were directly sequenced on an ABI 3130 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) using BigDye Terminator V.1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). *SLC9A6* encodes two alternatively spliced transcripts produced from alternative splicing donor sites in exon 2 which give rise to a long form designated as variant 1, and a short form called variant 2. Variant 1 and variant 2 code for NHE6.1 (isoform a) and NHE6.0 (isoform b), respectively (Fig. 1). The primers were designed to amplify each transcript variant. The primers sequence used for amplification and

sequencing are available on request. Genomic DNA (10 ng) extracted from peripheral blood was amplified in a total PCR volume of 20  $\mu$ l containing 1 $\times$  buffer, 0.4  $\mu$ M of each primer (forward/reverse), 0.18 mM dNTPs, 0.5 U AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA Polymerase (Applied Biosystems). The PCRs for all exons except exon one were performed at 94°C for 10 min followed by 30 cycles of 94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec, 72°C for 30 sec, then one cycle at 72°C for 7 min. The high CpG content of exon 1 required it to be amplified in a total reaction volume of 20  $\mu$ l containing 1 $\times$  buffer, 0.4  $\mu$ M of each primer, 0.2 mM dNTPs, 0.4 U Phusion<sup>®</sup> Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, Vantaa, Finland), and 3% DMSO. The thermocycling conditions for exon 1 were 98°C for 3 min followed by 35 cycles of 98°C for 10 sec, 65°C for 30 sec and 72°C for 30 sec and then one cycle of 72°C for 5 min. The PCR products were purified with Wizard<sup>®</sup> PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, WI) prior to sequencing. All mutations are referred to in relation to reference sequence NM\_001042537.

### Cell Culture and Cycloheximide Treatment

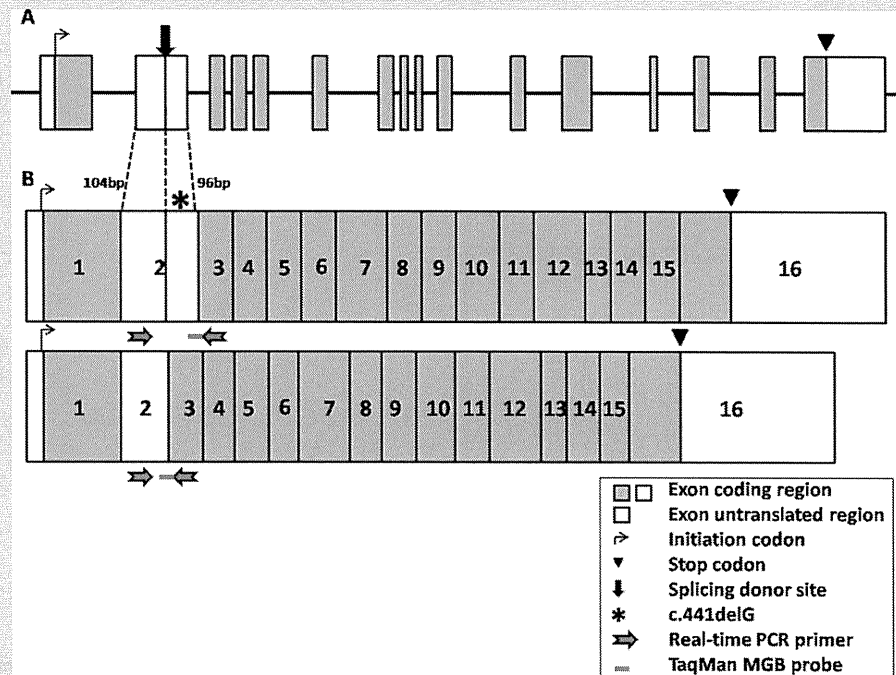
Epstein–Barr virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cells lines were established from peripheral blood cells using standard methods. To prevent potential degradation of transcripts containing premature translation termination codons (PTCs) by nonsense mediated mRNA decay (NMD), lymphoblastoid cells from the patient with the *SLC9A6* mutation and normal controls were treated with 100  $\mu$ g/ml cycloheximide (CHX) (Sigma, St. Louis, MO). This compound interferes with NMD through inhibition of protein synthesis [Aznarez et al., 2007]. CHX or a 0.1% DMSO control vehicle was used 4 hr prior to RNA extraction from the cell lines [Carter et al., 1995].

### RT-PCR

Total RNA from cultured lymphoblastoid cells from the patient and four normal controls, was extracted using the RNAqueous<sup>®</sup> Kit (Applied Biosystems). Reverse transcription was performed using 100 ng of total RNA and the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) in a total reaction volume of 20  $\mu$ l containing 1 $\times$  Random primers, 4 mM dNTP mix, 2.5 U of Multiscribe<sup>™</sup> Reverse Transcriptase, and 1  $\mu$ l of RNase Inhibitor. The reactions were incubated at 25°C for 10 min, then at 37°C for 120 min and then followed by 85°C for 5 min to inactivate the reverse transcriptase. Complementary DNA was then amplified using a primer set designed to amplify exon 2–5; forward 5'-GTCTTTTGGTGGGCCTTGT-3', reverse 5'-GTCCCCTTACC-TTCATCAG-3'. PCR products for NHE6.1 (transcript variant 1) and NHE6.0 (transcript variant 2) were 399 and 303 bp, respectively.

### Real-Time Quantification of *SLC9A6* mRNA

To measure *SLC9A6* transcript variant 1 and variant 2, both of which are alternative splicing products, primers and TaqMan<sup>®</sup> MGB probes were designed with Primer<sup>®</sup> Express Software (Applied Biosystems; Fig. 1). The Primer and MGB probe sequence



**FIG. 1. A: Genomic structure of the *SLC9A6* gene. B: Two alternatively spliced transcripts of the *SLC9A6* gene. Above: *SLC9A6* transcript variant 1 (encodes NHE6.1 or isoform a). Below: *SLC9A6* transcript variant 2 (encodes NHE6.0 or isoform b). The location of the *SLC9A6* mutation in our patient is shown with \*. Primers and probes used in real-time quantitative PCR are shown (horizontal arrows).**

for variant 1 were forward primer 5'-TGAGTATATGCTG-AAAGGAGAGATTAGTTC-3', reverse primer 5'-GATAGGA-GGAAGTAATATGTTGAAAAATACTTC-3', TaqMan MGB probe 5'-CTTAGAAAGGTTACTTTTGATCC-3'; and for variant 2 forward primer 5'-CTGTGAAAGTGCAGTCAAGTCCAA-3', reverse primer 5'-GATAGGAGGAAGTAATATGTTGAAAAATACTTC-3', TaqMan MGB probe 5'-CTACCTTACTGGTTA-CTTTTGA-3'. Human *GAPDH* MGB probe and primers purchased from Applied Biosystems were used as the internal control. Patient cDNA was transcribed from 10 ng of total RNA in a total volume of 25  $\mu$ l containing 1  $\times$  TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.9  $\mu$ M of each primer (sense/antisense) and 0.25  $\mu$ M of probe. Thermocycling was 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. Real-time quantitative PCR was performed using the ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems). The  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method was used for relative quantification.

### Western Blot Analysis

HeLa cells and cultured lymphoblastoid cells from the patient, mother and normal controls were washed with phosphate buffered saline and suspended in lysis buffer (phosphate buffered saline containing 1% Triton-X, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin A, and 1  $\mu$ g/ml leupeptin). HeLa cells expressing the NHE6.1 were used as a control. The cells were disrupted by sonication and

centrifuged at 20,000g for 10 min at 4°C. The supernatants were then resolved by SDS-polyacrylamide electrophoresis and transferred to polyvinylidene fluoride membrane (Millipore, Billerica, MA). NHE6 was detected with rabbit polyclonal anti-NHE6 antibody [Ohgaki et al., 2008], anti-rabbit IgG antibody conjugated with horseradish peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and chemiluminescence reagent (ECL Western Blotting Detection System; GE Healthcare, Waukesha, WI).

## RESULTS

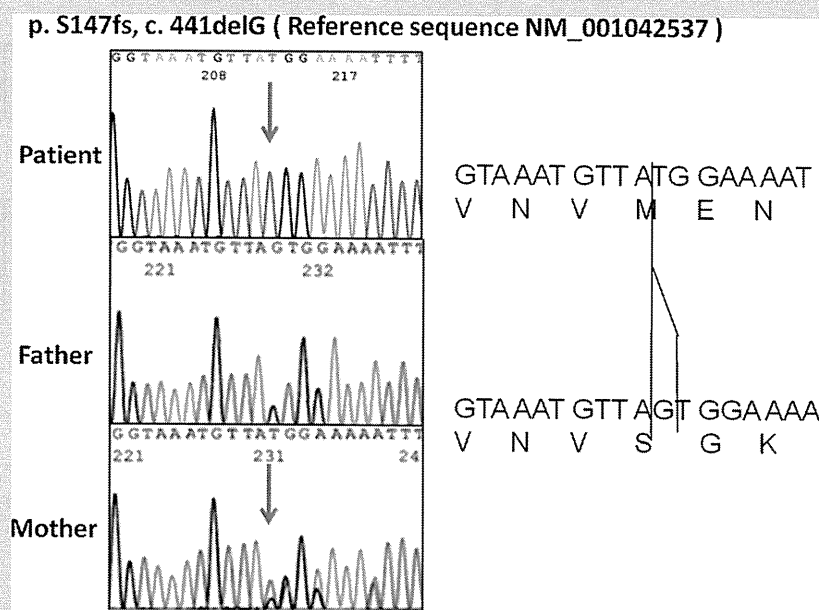
### Identification of a *SLC9A6* Mutation

We identified only one male patient with a frameshift mutation (c.441delG, p.S147fs) in exon 2, out of 22 male patients in the AS-like cohort (Fig. 2). This frameshift mutation causes a PTC. His healthy mother was heterozygous for the mutation.

No mutation in the *SLC9A6* gene was identified in the XMR cohort. However, two common polymorphisms (rs2291639, rs2307131), and one putative novel polymorphism in intron 12 (c.1692 +10 A>G) were detected.

### Clinical Features of the Patient With the *SLC9A6* Mutation

The affected male patient at birth suffered from mild neonatal asphyxia, however he had no other perinatal problems. His parents



**FIG. 2.** Chromatographs showing the *SLC9A6* mutation in our patient, and the equivalent genomic region in both his parents. The mutation c.441delG is located in exon 2 and is only present in transcript variant 1. His mother was heterozygous for this mutation, while his father did not have the mutation. This mutant transcript leads to premature protein truncation. The mutation is described relative to reference sequence NM\_001043537. [Color figure can be seen in the online version of this article, available at [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1552-485X](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1552-485X)]

were non-consanguineous and he did not have any family history of neurological diseases. Although formal clinical assessment was not conducted to the mother, she is healthy and does not have intellectual disability. His clinical features are summarized in Table I. He showed typical findings of AS; severe developmental delay with absence of verbal language, generalized hypotonia, easily provoked laughter, epilepsy, ataxia, strabismus, and microcephaly. His occipitofrontal head circumference at birth was 33.8 cm (+0.4 SD), but his head growth has decelerated into 51.5 cm (−3.0 SD) at 18 years of age. He acquired head control at three months of age, sat and crawled at 6 months of age, and walked unassisted at 18 months of age. His first epileptic attack occurred at 4 years of age. After this first attack, he lost his ability to walk until he was 5 years old. His epileptic attacks consisted of multiple types of seizures, and they were difficult to control with ACTH or several anti-epileptic drugs. TRH treatment improved his awakening and activity levels, and he transiently acquired the ability to walk. However, subsequently his ability to walk was lost, probably due to exacerbation of ataxia. His deep tendon reflex was not increased and no other features of spasticity or peripheral neuropathy were identified. His EEG findings included a background frequency of 5–6 Hz theta waves and spontaneous appearance of 3 Hz diffuse high voltage slow waves. TRH did not change the frequency of his seizures or his EEG findings. He showed no cerebellar atrophy on magnetic resonance imaging (MRI) at 5 years of age. MRS was not performed. He had a normal G-banding karyotype.

### Downregulation of the *SLC9A6* Variant 1 in the Patient With the Mutation

The identified mutation c.441delG is located in exon 2 and is only present in variant 1 (Fig. 1). Therefore, the mutation only affects NHE6.1, leaving NHE6.0 intact. Reverse transcriptase PCR demonstrated that *SLC9A6* variant 1 mRNA expression decreased in our patient (Fig. 3A) compared to that in four normal controls. On the other hand, variant 2 expression was increased in the patient compared to the controls. To further investigate mutant *SLC9A6* gene expression, real-time quantitative PCR (qPCR) was performed using cDNA from the patient and normal controls. Quantitative PCR confirmed that *SLC9A6* variant 1 was significantly downregulated in the patient, while it was not downregulated in normal controls (Fig. 4A). Furthermore, the *SLC9A6* variant 2 mRNA in the patient was significantly increased compared to normal controls (Fig. 4B).

### Nonsense Mediated Decay Was Involved in the Downregulation of Mutant *SLC9A6* in the Patient

To investigate the possible involvement of NMD in the downregulation of mutant *SLC9A6* in the patient's lymphoblastoid cells, we treated the cells with CHX. After CHX treatment, the expression level of *SLC9A6* variant 1 increased compared to normal control samples on RT-PCR (Fig. 3B). It was also proved that the expression level of variant 1 was significantly increased by performing qPCR, while the expression level in normal control samples

TABLE I. Clinical Findings in Affected Males Previously Reported and Our Patient

Family number: report affected males number (examined number)	1: Gilfillan et al. [2008] 3 (3)	2: Gilfillan et al. [2008] 2 (1)	3: Gilfillan et al. [2008] 3 (3)	4: Gilfillan et al. [2008], Christianson et al. [1999] 16 (4)	5: Schroer et al. [2010] 6 (6)	6: Schroer et al. [2010] 1 (1)	Our patient
Development and behavior							
Profound delay	+	+	+	+	+	+	+
Verbal language absent	+	+	+	+	+	+	+
Easily provoked laughter	+	+	+	+	3/6	—	+
CNS findings							
Epilepsy	+	+	+	+	+	+	+
Ataxia	+	+	+	+	NR	NR	+
Hyperkinetic movements	2/3	—	+	—	2/6	NR	—
Strabismus	+	+	+	+	5/6	+	+
Physical findings							
Microcephaly	+	+	+	3/4	5/6	+	+
Open mouth + drooling	2/3	+	+	NR	4/6	+	+
Swallowing difficulty	2/3	+	1/3	1/4	NR	+	—
Flexed arms	+	NR	1/3	+	3/6	—	—
Electroencephalography							
Epileptiform activity	+	+	+	+	+	+	+
Background activity	10–11 Hz	1.5–3 Hz	4–7 Hz	3–6 Hz to 11–14 Hz	NR	$\alpha$ rhythm	5–6 Hz
Brain MRI/autopsy							
Cerebellar atrophy	1/3	NR	NR	2/4	2/6	+	—
Mutation	p.E287_S288del c.936_941delAAAGTG	p.R500X c.1574C → T	p.V176_201del c.679 +1 delGTAA	p.H203fs c.684_685delAT	p.R500X c.1574C → T	p.Q437X c.1391C → T	p.S147fs c.441delG

+, present with all the patients; —, not present; NR, not recorded.

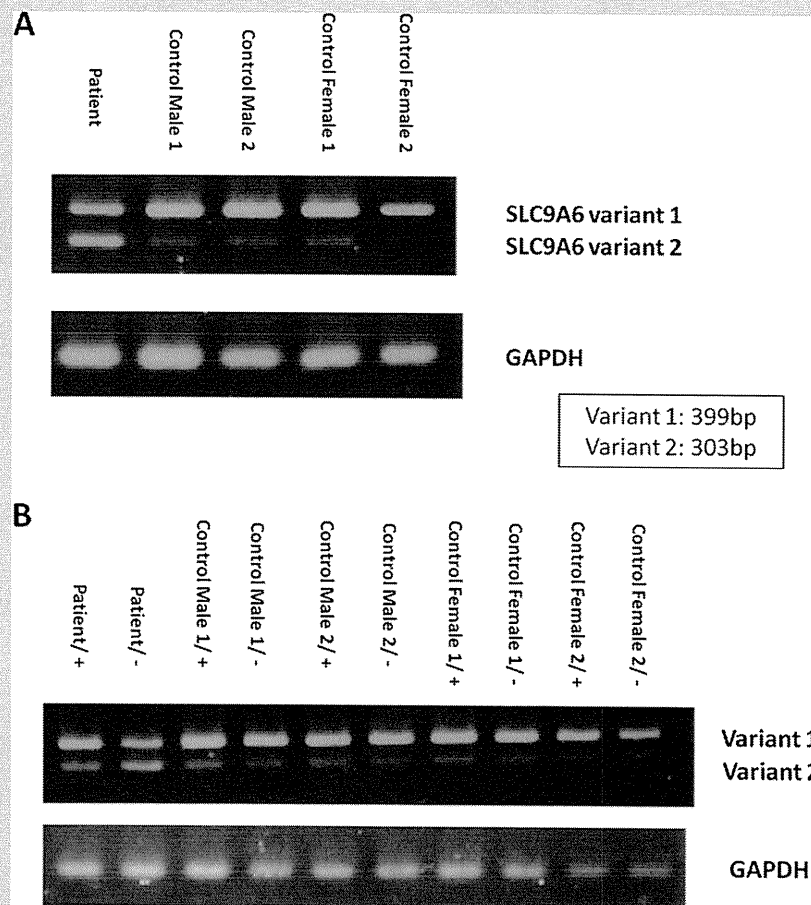


FIG. 3. RT-PCR amplification of the *SLC9A6* gene. A: *SLC9A6* variant 1 mRNA expression was decreased in the patient compared to that in four normal controls. On the other hand, variant 2 expression was increased in the patient compared to that in the controls. B: CHX treatment increases the mutant *SLC9A6* variant 1 mRNA expression, leading to similar expression levels in the patient and four normal controls samples. [+] After CHX treatment, [-] no CHX treatment.

was unchanged (Fig. 4A). The expression level of *SLC9A6* variant 2 increased in all samples after CHX treatment, however the increase was significant only in control samples (Fig. 4B).

### Decreased Expression of the NHE6 Protein From Mutant *SLC9A6*

Western blotting was performed to investigate expression of the NHE6 protein in the homogenate of lymphoblastoid cell lines from the patient and his mother. As a result, protein expression of NHE6.1 was not detected in the patient (Fig. 5A,B). The same NHE6.1 was detected in HeLa cells and cells from the patient's mother as well as in the controls. NHE6.0, which was expected to be 10–20 kDa smaller than NHE6.1 on SDS-PAGE [Ohgaki et al., 2008], was not detected in any sample (Fig. 5B).

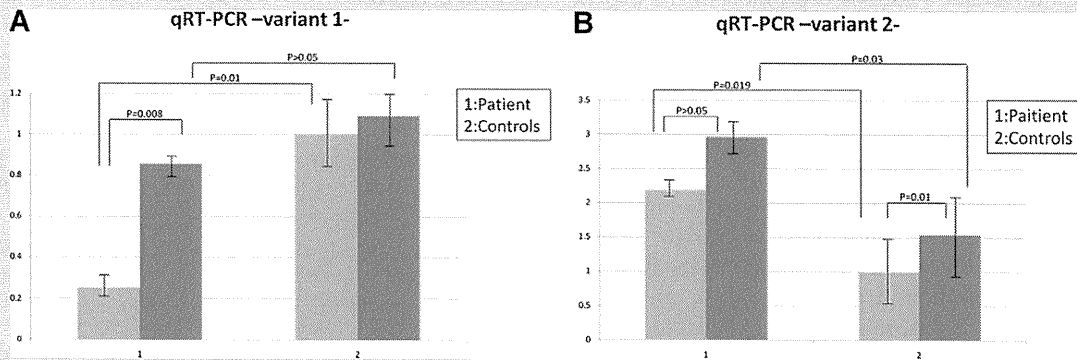
### DISCUSSION

In this study we investigated 22 male AS-like patients and 104 male patients with XMR, and identified only one AS-like patient with a *SLC9A6* frameshift mutation. This result further confirms *SLC9A6* is not a major cause of AS-like cases, as reported by Fichou et al. [2009]. Although the number of patients with XMR in this study was small, *SLC9A6* is likely to account for only small proportion of XMR cases.

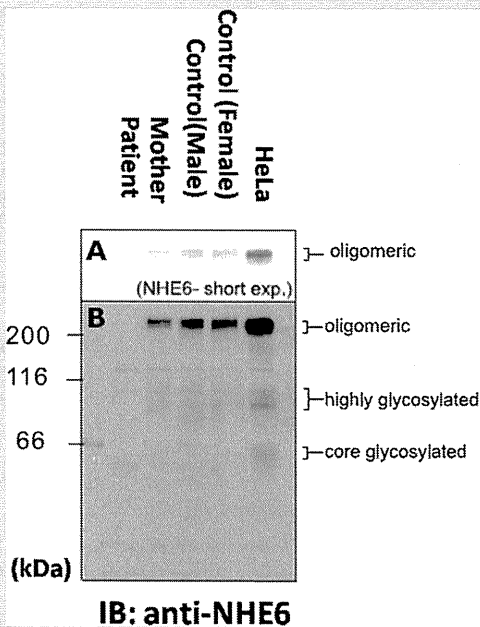
Patients with *SLC9A6* mutations reported by Gilfillan et al., exhibit cardinal features similar to those of AS including severe developmental delay, mental retardation with absent or minimal use of words, easily provoked laughter, ataxia, epilepsy, hyperkinetic movement, nystagmus, and microcephaly.

Gilfillan et al. also identified possible features of difference between these patients and AS patients, including slow progression of symptoms, thin body, cerebellar atrophy, increased glutamate/





**FIG. 4.** Real-time quantitative PCR in samples from cell lines from the patient and four normal controls containing two males and two females. The light gray bars indicate the expression levels of *SLC9A6* before CHX treatment, while deep gray bars after CHX treatment. We performed statistical analysis using paired and unpaired Student's *t*-test. Error bars show standard deviation. **A:** The *SLC9A6* variant 1 was significantly downregulated in samples from the patient while it was not downregulated in samples from four normal controls. After CHX treatment, expression level of the *SLC9A6* variant 1 mRNA in the patient's sample was significantly increased. **B:** The *SLC9A6* variant 2 in the patient's sample was significantly increased compared to normal controls. Expression level of *SLC9A6* variant 2 increased in all samples after CHX treatment, but a significant increase was only seen in samples from controls.



**FIG. 5.** Protein expression of NHE6 in cultured lymphoblastoid cells and HeLa cells. In the patient, no protein expression of NHE6 isoforms was detected with Western blotting using anti-NHE6 antibody. **A:** A cropped image taken using a short exposure time demonstrating the oligomeric form of NHE6. Protein size in kDa is shown by numbers on the left of the image. **B:** A chemiluminescence image of Western blotting taken with a longer exposure time.

glutamic acid peak on MRS, and rapid frequency of 10–14 Hz waves on EEG (Table I). Our patient lost his ability to walk although he did not demonstrate spasticity, demonstrating a slowly progressive clinical course consistent with findings in Gilfillan's report. Indeed, slow progression may be a distinctive clinical feature for patients with *SLC9A6* mutations. One of the families which Gilfillan et al. investigated was previously reported by Christianson et al. [1999], and designated as Christianson syndrome. Schroer et al. reported patients with Christianson syndrome, and they showed that the patients demonstrated an AS-like phenotype. However, while the clinical features of our patient were consistent with those of most patients previously reported by Gilfillan, there were differences including the EEG findings and lack of cerebellar atrophy. Despite this, our patient did meet the diagnostic criteria for AS [Williams et al., 2006]. Therefore, this study further demonstrated that a patient with a *SLC9A6* mutation may resemble patients with AS. Further, this striking similarity between patients with AS and those with *SLC9A6* mutations suggests a possible relationship between the gene function of *UBE3A* and *SLC9A6* in the developing brain.

Our patient's mutation created a frameshift resulting in 7 missense amino acids followed by a stop codon. This mutation was present only in *SLC9A6* transcript variant 1. *SLC9A6* mRNA has two transcript variants caused by alternative splicing in exon 2 (Fig. 1), but the role of each variant has not been clarified. The mutation detected in our patient only affects variant 1 sequence, but the phenotype of the patient was as severe as those in previously reported patients. Therefore, our finding suggests that the NHE6.1 plays an important role in brain function.

Nonsense mediated decay is involved in regulating the expression of alternatively spliced forms containing PTCs [Lareau et al., 2007; Ni et al., 2007]. Since the identified mutation was predicted to result in a PTC, we speculated that NMD could be involved in disease pathogenesis. The result of qRT-PCR showed a significant

decrease in *SLC9A6* variant 1 mRNA expression in the patient sample. This reduction was restored by CHX treatment, while *SLC9A6* variant 1 expression was unaltered by CHX treatment in normal control samples. Expression of *SLC9A6* variant 2 in the patient on the other hand, was significantly increased compared to that in control samples, however it was not influenced by CHX treatment. Therefore, the c.441delG mutation in the patient seems to have modified the alternative splicing pattern, leading to an increase in variant 2 expression. Alternatively, low variant 1 could trigger a regulatory feed back on transcription causing the apparent increase in variant 2 expression. A mutation causing premature protein truncation could alter the splicing pattern and lead to exon skipping, use of alternative splice sites, and intron retention [Hentze and Kulozik, 1999; Mendell and Dietz, 2001]. Our results indicated that the c.441delG mutation caused a PTC altered the splicing pattern, and activated NMD machinery then downregulated *SLC9A6* variant 1 expression.

As protein NHE6.1 was not detected, this indicates an absence of intact NHE6.1. NHE6.0 was also not detected. These findings conclusively indicated that the identified mutation should cause total loss-of-function. Recently, Garbern et al. identified cases with an in-frame deletion of three amino acids, who showed milder dysmorphic features and higher gross motor abilities than those in cases previously reported [Garbern et al., 2010]. Their in-frame deletion should not cause total loss-of-function but create a mildly dysfunctional protein. Therefore, severe phenotypes including severe developmental delay and progressive neurological deterioration may be caused by truncated mutations and less severe phenotypes may be caused by missense or in-frame mutations, and such mild phenotypes are likely missed in patients with mild developmental delay.

Given that the *SLC9A6* variant 2 was upregulated, we speculated that upregulated variant 2 might partially compensate for the absence of NHE6.1. However, we could not establish the upregulation of the NHE6.0 protein, rather it was not detected in the patient's lymphoblastoid cells. NHE6.0 may be unstable compared to NHE6.1. Alternately, NHE6.0 translation may be inhibited. Further investigation is required to definitively answer this question.

NHE6 is found in the membranes of early recycling endosomes and transiently in plasma membranes. Its distribution is regulated by RACK1 [Ohgaki et al., 2008]. Recycling endosomal trafficking is essential for the growth of dendritic spines during LTP in the brain [Park et al., 2006]. The function of the protein product of *UBE3A*, E3 ubiquitin ligase, is also associated with dendritic spine morphology. Mice with a maternal null mutation in *Ube3a* are also reported to have defects in LTP, and manifest motor and behavioral abnormalities [Jiang et al., 1998]. In a recent study, *Ube3a* deficient mice demonstrated dendritic spine dysmorphology [Dindot et al., 2008]. Thus, *UBE3A* and *SLC9A6* could interact in a common pathway involved in dendritic spine development, with a mutation in either leading to an AS-like phenotype.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Tadashi Ariga for critical reading of the manuscript.

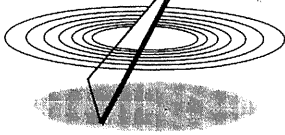
## REFERENCES

- Aznarez I, Zielenski J, Rommens JM, Blencowe BJ, Tsui LC. 2007. Exon skipping through the creation of a putative exonic splicing silencer as a consequence of the cystic fibrosis mutation R533X. *J Med Genet* 44: 341–346.
- Brett CL, Wei Y, Donowitz M, Rao R. 2002. Human Na(+)/H(+) exchanger isoform 6 is found in recycling endosomes of cells, not in mitochondria. *Am J Cell Physiol* 5:1031–1041.
- Carter MS, Doskow J, Morris P, Li S, Nhim RP, Sandstedt S, Wilkinson MF. 1995. A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro. *J Biol Chem* 270:28995–29003.
- Christianson AL, Stevenson RE, van der Meyden CH, Pelsler J, Theron FW, van Rensburg PL, Chandler M, Schwartz CE. 1999. X linked severe mental retardation, craniofacial dysmorphism, epilepsy, ophthalmoplegia, and cerebellar atrophy in a large South African kindred in localized to Xq24–q27. *J Med Genet* 36:759–766.
- Dindot SV, Antalffy BA, Bhattacharjee MB, Beaudet AL. 2008. The Angelman syndrome ubiquitin ligase localizes to the synapse and nucleus, and maternal deficiency results in abnormal dendritic spine morphology. *Hum Mol Genet* 17:111–118.
- Fichou Y, Bahi-Buisson N, Nectoux J, Chelly J, Heron D, Cuisset L, Bienvenu T. 2009. Mutation in the *SLC9A6* gene is not a frequent cause of sporadic Angelman-like syndrome. *Eur J Hum Genet* 17:1378–1380.
- Garbern JY, Neumann M, Trojanowski JQ, Lee VM, Feldman G, Norris JW, Friez MJ, Schwartz CE, Stevenson R, Sima AA. 2010. A mutation affecting the sodium/proton exchanger, *SLC9A6*, causes mental retardation with tau deposition. *Brain* 133:1391–1402.
- Gillfillan GD, Selmer KK, Roxrud I, Smith R, Kyllerman M, Eiklid K, Kroken M, Mattingsdal M, Egeland T, Stenmark H, Sjöholm H, Server A, Samuelsson L, Christianson A, Tarpey P, Whibley A, Stratton MR, Futreal A, Teague J, Edkins S, Gez J, Turner G, Raymond FL, Schwartz C, Stevenson RE, Undlien DE, Stromme P. 2008. *SLC9A6* mutations cause X-linked mental retardation, microcephaly, epilepsy, and ataxia, a phenotype mimicking Angelman Syndrome. *Am J Hum Genet* 82: 1003–1010.
- Hentze MW, Kulozik AE. 1999. A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 96:307–310.
- Jiang YH, Armstrong D, Albrecht U, Atkins CM, Noebels JL, Eichele G, Sweatt JD, Beaudet AL. 1998. Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. *Neuron* 21:799–811.
- Lareau LF, Inada M, Green RE, Wengrod JC, Brenner SE. 2007. Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. *Nature* 446:926–929.
- Mendell JT, Dietz HC. 2001. When the message goes awry: Disease-producing mutations that influence mRNA content and performance. *Cell* 107:411–414.
- Nakamura N, Tanaka S, Teko Y, Mitsui K, Kanazawa H. 2005. Four Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. *J Biol Chem* 280:1561–1572.
- Ni JZ, Grate L, Donohue JP, Preston C, Nobida N, O'Brien G, Shiue L, Clark TA, Blume JE, Ares M, Jr. 2007. Ultraconserved elements are associated with homeostatic control of splicing regulators by alternative splicing and nonsense-mediated decay. *Genes Dev* 21:708–718.
- Ohgaki R, Fukura N, Matsushita M, Mitsui K, Kanazawa H. 2008. Cell surface levels of organellar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 6 are regulated by interaction with RACK1. *J Biol Chem* 283:4417–4429.

- Park M, Salgado JM, Ostroff L, Helton TD, Robinson CG, Harris KM, Ehlers MD. 2006. Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron* 52:817–830.
- Roxrud I, Raiborga C, Gilfillan GD, Strømmed P, Stenmark H. 2009. Dual degradation mechanisms ensure disposal of NHE6 mutant protein associated with neurological disease. *Exp Cell Res* 135:3014–3027.
- Saitoh S, Wada T, Okajima M, Takano K, Sudo A, Niikawa N. 2005. Uniparental disomy and imprinting defects in Japanese patients with Angelman syndrome. *Brain Dev* 27:389–391.
- Schroer RJ, Holden KR, Tarpey PS, Matheus MG, Griesemer DA, Friez MJ, Fan JZ, Simensen RJ, Stromme P, Stevenson RE, Stratton MR, Schwartz CE. 2010. Natural history of Christianson syndrome. *Am J Med Genet Part A* 152A:2775–2783.
- Takano K, Nakagawa E, Inoue K, Kamada F, Kure S, Goto Y, Japanese Mental Retardation Consortium. 2008. A loss-of-function mutation in the FTSJ1 gene causes nonsyndromic X-linked mental retardation in a Japanese family. *Am J Med Genet Part B* 147B:479–484.
- Williams CA, Beaudet AL, Clayton-Smith J, Knoll JH, Kyllerman M, Laan LA, Magenis RE, Moncla A, Schinzel AA, Summers JA, Wagstaff J. 2006. Angelman Syndrome 2005: Updated consensus for diagnostic criteria. *Am J Med Genet Part A* 140A:413–418.

# 遺伝カウンセリング

診断の指針 治療の指針



齋藤加代子<sup>\*2\*3</sup> 荒川 玲子<sup>\*1\*3</sup>  
SAITO Kayoko ARAKAWA Reiko

はじめに

National Society of Genetic Counselors は、2005年に遺伝カウンセリングを次のように定義している。

「人々が遺伝性疾患における医学的、心理学的、家族的影響について理解し、それに適応できるように支援するプロセスである。このプロセスは、以下を統合したものである。

- ・疾患の発生または再発の可能性を評価するための家族歴や病歴の解釈
- ・遺伝、検査、管理、予防、資源、および研究に関する教育
- ・リスクまたは状況に対するインフォームド・チョイスや適応を促すためのカウンセリング」

遺伝カウンセリングは、遺伝に関する不安に対してメンデル遺伝の法則、経験的再発率、Bayes 分析などにより確率的回答をする時代から、遺伝子検査を行い、同定された遺伝子変異によって疾患の確定診断・治療方針の決定を行い、本人および血縁者の発症前診断、保因者診断、出生前診断がなされる時代になってきた。主治医、臨床遺伝の専門家、臨床心理専門職、遺伝看護師、ソーシャルワーカーなどが協力をしてチーム医療を行い、遺伝学に関する正しい知識と情報を共有し、本人・家族への医療、心理、社会的支援を行うことが遺伝カウンセリングである。

## 1. 遺伝子情報の取扱い

UNESCO の「ヒト遺伝情報に関する国際宣言(2003)」第14条では、「プライバシー及び機密性」として、「個人を特定できるヒト遺伝情報、ヒトのプロテオーム情報及び生物学的試料は(中略)第三者、特に雇用主、保険会社、教育機関及び家族に対して開示、若しくは入手可能とすべきではない。ヒト遺伝情報、ヒトのプロテオーム情報及び生物学的試料を使用する研究に参加する個人のプライバシーは保護され、これらの情報は機密情報として取扱われるべきである」と述べられて

いる。厚生労働省「医療・介護関係事業者における個人情報取扱いの適切な取扱いのためのガイドライン(2004)」にも「これが漏えいした場合には、本人及び血縁者が被る被害及び苦痛は大きなものとなるおそれがある。したがって、検査結果及び血液等の試料の取扱いについては、UNESCO 国際宣言、医学研究分野の関連指針及び関連団体等が定めるガイドラインを参考とし、特に留意する必要がある」とされている。

一方で、薬理遺伝学的検査(PGx 検査)の臨床現場における普及により、薬剤の副作用の出現予測や薬剤必要量の予測が可能となった。被験者の薬物治療において、遺伝子情報である PGx 検査結果を医師、看護師、薬剤師、臨床検査技師などが共有することで、副作用の出現を防ぎ、適正量を投与するオーダーメイド医療がなされる。遺伝子情報ならば何もかも厳重なセキュリティの下に置かなければならないとすると、むしろ弊害が出現することになる。遺伝子情報の内容に合わせた適切なレベルの取扱いが求められる。

## 2. 遺伝カウンセリングとは

「遺伝カウンセリング」について、UNESCO の「ヒト遺伝情報に関する国際宣言(2003)」第11条では「健康に関わる重要な意味を持つ可能性がある遺伝学的検査を行おうとする場合、当事者が遺伝カウンセリングを適切な方法で受けられるようにすべきである。遺伝カウンセリングは非指示的であり、文化的に適合したものであり、かつ当事者の最大の利益と一致したものであるべきである」と述べている。

遺伝カウンセリング(図1)では、①当事者が情報に基づいて決定できるように、個人やカップルに対し、選択肢や医学知識について理解を深めるために援助し、②当事者がよく理解したうえで、その遺伝的問題に対処していくように援助する。また、③罪の意識を取り除き、④個人やカップルが親となることへの目標を到達できるように援助する。したがって、遺伝カウ

\*1東京女子医科大学附属遺伝子医療センター \*2教授 \*3同 大学院先端生命医科学系専攻遺伝子医学分野  
Key words 遺伝子検査 遺伝学的検査 遺伝カウンセリング 遺伝情報

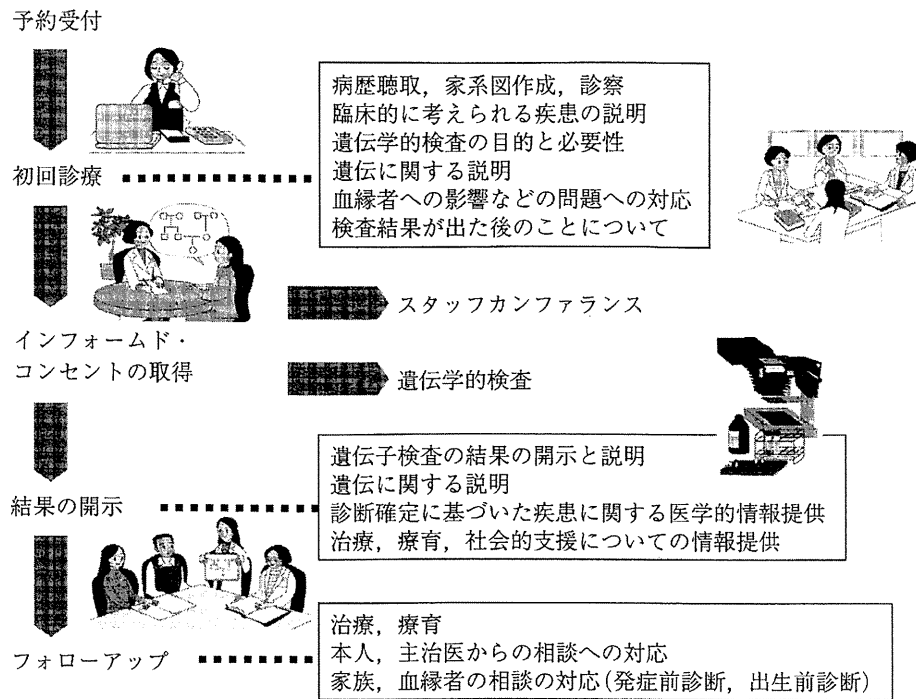


図1 遺伝カウンセリングの流れ(東京女子医科大学 遺伝子医療センターの例)

ンセリングにあたる者としては、疾患に対する正しい知識と情報の入手に努めなければならない。近年の分子生物学の進歩によって、遺伝医学はめざましく発展し、疾患の原因遺伝子や原因蛋白質が明らかになってきた。このような進歩によって、患者とその家族の遺伝に関する疑問にかなり正確に答えられるようになってきている。

遺伝医学関連学会による「遺伝学的検査に関するガイドライン(2003)」は、遺伝学的検査が医療全域にわたって広く有効に利用される時代に対応して、2011年に日本医学会「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」として改訂がなされ発表された。この改訂では、すでに発症している患者の診断目的として行われる遺伝学的検査において、各診療科の医師自身が遺伝に関する十分な理解と知識および経験をもつことが重要であり、検査の意義や目的の説明とともに、結果が得られた後の状況や検査結果が血縁者に影響を与える可能性があることなどについて十分に説明し、被験者が理解して自己決定できるように支援する体制を整えることを述べている。それは、いわゆる広義の遺伝カウンセリングである。医療機関は、遺伝医学の基本的事項および個人の遺伝情報の取扱いに関する啓発や教育を行い、適切な遺伝医療を実施できる体

制を整備することが望まれる。

自分が発症するか(発症前診断)、自分は発症しないが保因者であるか(保因者診断)、妊娠中の胎児がある疾患に罹患しているか(出生前診断)などに関する遺伝カウンセリングは、臨床遺伝学の専門的知識・経験をもち、遺伝カウンセリングに習熟した臨床遺伝の専門家すなわち、臨床遺伝専門医(日本人類遺伝学会と日本遺伝カウンセリング学会の共同認定)などにより被検者の心理状態をつねに把握しながら行われる。遺伝カウンセリングを担当する非医師の職種として上記2学会の共同認定の認定遺伝カウンセラー育成も大学院教育としてなされており、遺伝医療、遺伝教育、さらに企業において活躍を開始している。遺伝カウンセリングでは、本人・家族・血縁者(クライアント)に対して、生活設計上の選択を自らの意思で決定し行動できるよう臨床遺伝学的診断を行い、遺伝医学的判断に基づき遺伝予後などの適切な情報を提供し支援する。クライアントと遺伝カウンセリング担当者との良好な信頼関係に基づき、さまざまなコミュニケーションが行われ、この過程で医療的・心理的・精神的援助がなされる。決して一方的な情報提供だけではないことに留意すべきである。

# 遺伝子診療のなかでの 遺伝カウンセリングの基礎と実践

齋藤加代子\*1,2 浦野真理\*1 松尾真理\*1 佐藤裕子\*2

ゲノム研究の進歩により、診療の現場において確定診断としての遺伝子検査が利用され、発症前診断、保因者診断、出生前診断が可能な時代となった。遺伝子情報は個人と血縁者で共通性があり診断結果が血縁者へ影響を及ぼす場合がある。遺伝子情報漏洩の危険性、遺伝的差別への危惧など倫理的法的社会的問題が生じる可能性もある。このような背景を考へて、遺伝カウンセリング実施体制の構築が必要である。ここでは、遺伝性疾患を例として、遺伝カウンセリングの基礎と実践について述べる。

## はじめに

National Society of Genetic Counselors は、2006年に遺伝カウンセリングを次のように定義している<sup>1)</sup>。

「人々が遺伝性疾患における医学的、心理学的、家族的影響について理解し、それに適応できるように支援するプロセスである。このプロセスは、以下を統合したものである。

- 疾患の発生または再発の可能性を評価するための家族歴や病歴の解釈
- 遺伝、検査、管理、予防、資源、および研究に関する教育
- リスクまたは状況に対するインフォームドチョイスや適応を促すためのカウンセリング

遺伝カウンセリングは、遺伝に関する不安に対してメンデル遺伝の法則、経験的再発率、Bayes分析などにより確率的回答をする時代か

ら、遺伝子検査を行い、同定された遺伝子変異から疾患の確定診断・治療方針の決定を行い、本人および血縁者の発症前診断、保因者診断、出生前診断がなされる時代になってきた。主治医、臨床遺伝の専門家、臨床心理専門職、遺伝看護師、ソーシャルワーカーなどが協力をしてチーム医療を行い、遺伝学に関する正しい知識と情報を共有し、本人・家族への医療、心理、社会的支援を行うことが遺伝カウンセリングである。

## 1. 遺伝子情報の取り扱い

UNESCOの「ヒト遺伝情報に関する国際宣言(2003)」<sup>2)</sup>第14条では、「プライバシー及び機密性として、個人を特定できるヒト遺伝情報、ヒトのプロテオーム情報及び生物学的試料は(中略)第三者、特に雇用主、保険会社、教育機関及び家族に対して開示、若しくは入手可能とすべきではない。ヒト遺伝情報、ヒトのプロテ

\*1, 2 Saito Kayoko \*1 東京女子医科大学附属遺伝子医療センター, \*2 東京女子医科大学大学院先端生命医科学系専攻 遺伝子医学分野

\*1 Urano Mari, Matsuo Mari

\*2 Sato Yuko

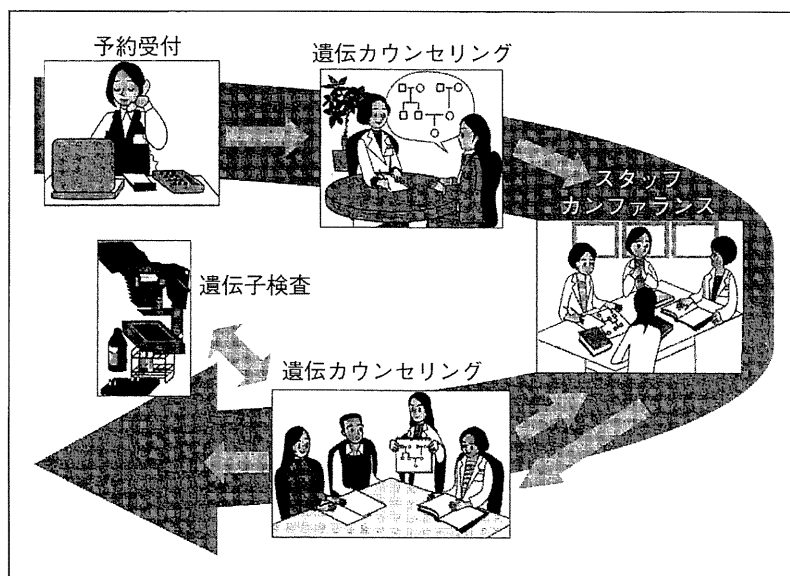


図1 遺伝カウンセリングの流れ（東京女子医科大学遺伝子医療センターの例）

オーム情報及び生物学的試料を使用する研究に参加する個人のプライバシーは保護され、これらの情報は機密情報として取扱われるべきである」と述べられている。厚生労働省「医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン（2004）」<sup>3)</sup>にも「これが漏えいした場合には、本人及び血縁者が被る被害及び苦痛は大きなものとなるおそれがある。したがって、検査結果及び血液等の試料の取扱いについては、UNESCO 国際宣言、医学研究分野の関連指針及び関連団体等が定めるガイドラインを参考とし、特に留意する必要がある。」とされている。一方で、薬理遺伝学的検査（PGx 検査）の臨床現場における普及により、薬剤の副作用の出現予測や薬剤必要量の予測が可能となった。被験者の薬物治療において、遺伝子情報である PGx 検査結果を医師、看護師、薬剤師、臨床検査技師などが共有することで、副作用の出現を防ぎ、適正量を投与するオーダーメイド医療がなされる。遺伝子情報ならば何もかも厳重なセキュリティのもとに置かなければならないとすると、むしろ弊害が出現することになる。遺伝子情報の内容に合わせた適切なレベルの取り扱いが求められる。

## 2. 遺伝カウンセリングとは

「遺伝カウンセリング」について、UNESCO の「ヒト遺伝情報に関する国際宣言（2003）」<sup>2)</sup> 第 11 条では「健康に関わる重要な意味を持つ可能性がある遺伝学的検査を行おうとする場合、当事者が遺伝カウンセリングを適切な方法で受けられるようにすべきである。遺伝カウンセリングは非指示的であり、文化的に適合したものであり、かつ当事者の最大の利益と一致したものであるべきである。」と述べている。

遺伝カウンセリング（図 1）では、①当事者が情報に基づいて決定できるように、個人やカップルに対し、選択肢や医学知識について理解を深めるために援助し、②当事者がよく理解した上で、その遺伝的問題に対処していくように援助する。また、③罪の意識を取り除き、④個人やカップルが親となることへの目標を到達できるように援助する。したがって、遺伝カウンセリングにあたる者としては、疾患に対する正しい知識と情報の入手に努めなければならない。近年の分子生物学の進歩によって、遺伝医学はめざましく発展し、疾患の原因遺伝子や原因蛋白質が明らかになってきた。このような進

歩によって、患者とその家族の遺伝に関する疑問にかなり正確に答えられるようになってきている。

遺伝医学関連学会による「遺伝学的検査に関するガイドライン (2003)」<sup>4)</sup>は、遺伝学的検査が医療全域にわたって広く有効に利用される時代に対応して、2011年に日本医学会「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」<sup>5)</sup>として改訂がなされた。この改訂では、すでに発症している患者の診断目的として行われる遺伝学的検査において、各診療科の医師自身が遺伝に関する十分な理解と知識および経験を持つことが重要であり、検査の意義や目的の説明とともに、結果が得られた後の状況や検査結果が血縁者に影響を与える可能性があることなどについて十分に説明し、被験者が理解して自己決定できるように支援する体制を整えることを述べている。それは、いわゆる広義の遺伝カウンセリングである。医療機関は、遺伝医学の基本的事項および個人の遺伝情報の取り扱いに関する啓発や教育を行い、適切な遺伝医療を実施できる体制を整備することが望まれる。

自分が発症するか(発症前診断)、自分は発症しないが保因者であるか(保因者診断)、妊娠中の胎児がある疾患に罹患しているか(出生前診断)などに関する遺伝カウンセリングは、臨床遺伝学の専門的知識・経験を持ち、遺伝カウンセリングに習熟した臨床遺伝の専門家すなわち、臨床遺伝専門医(日本人類遺伝学会と日本遺伝カウンセリング学会の共同認定)などにより被検者の心理状態を常に把握しながら行われる。遺伝カウンセリングを担当する非医師の職種として上記二学会の共同認定の認定遺伝カウンセラー育成も大学院教育としてなされており、遺伝医療、遺伝教育、さらに企業において活躍を開始している。遺伝カウンセリングでは、本人・家族・血縁者(クライアント)に対して、生活設計上の選択を自らの意思で決定し行動できるよう臨床遺伝学的診断を行い、遺伝医学的判断に基づき遺伝予後などの適切な情報を提供し支援する。クライアントと遺伝カウンセ

リング担当者との良好な信頼関係に基づき、様々なコミュニケーションが行われ、この過程で医療的心理的・精神的援助がなされる。決して一方的な情報提供だけではないことに留意すべきである。

## 1 遺伝カウンセリングの進め方 (図1)

図1に示すように、遺伝カウンセリングを希望する場合には、電話で予約受付を受けることが多い。初回の遺伝カウンセリングにおいて、発端者(罹患者)とその家族(クライアント)の疾患に関する状況(主治医からの紹介状、発端者本人の症状、経過、検査所見など)、家族歴を聴取する。ここで、家系図は遺伝カウンセリングの基本である。図2に家系図を記録する場合に用いる記号の主なものと家系図の一例としてX連鎖劣性遺伝形式をとる副腎白質ジストロフィーの家系を図示した<sup>6)</sup>。できるだけ詳しく、3世代ぐらひは遡って情報を得ることが望ましい。家系図を分析することにより遺伝形式がわかり、疾患の診断がなされたり、否定されたりする。例えば、各世代の男女に同様の疾患の患者が認められるとき、常染色体性劣性遺伝は否定される。また、母親を介して疾患が遺伝していることが考えられるとき、X連鎖性疾患やミトコンドリア病を考える。父と息子が同様の疾患であるとき、X連鎖性の疾患は否定される。

遺伝カウンセリングにおいて、疾患の確定診断は重要であり、筋ジストロフィーにおいても、脊髄性筋萎縮症においても、確定診断が違えば遺伝形式が異なり、また原因の遺伝子変異も同定できない。そして、誤った情報に基づく遺伝カウンセリングとなる。

## 2 遺伝カウンセリングにおける情報提供

対象とする疾患は、どのような特徴を持っているか、どのように診断をするのか、診断がついたらどのようにするかなどの情報提供を行う。われわれは、疾患に関する簡単な文書を渡して説明をしている。また、必要に応じて医療社会福祉に関する情報提供またはソーシャルワーカーの紹介をする。



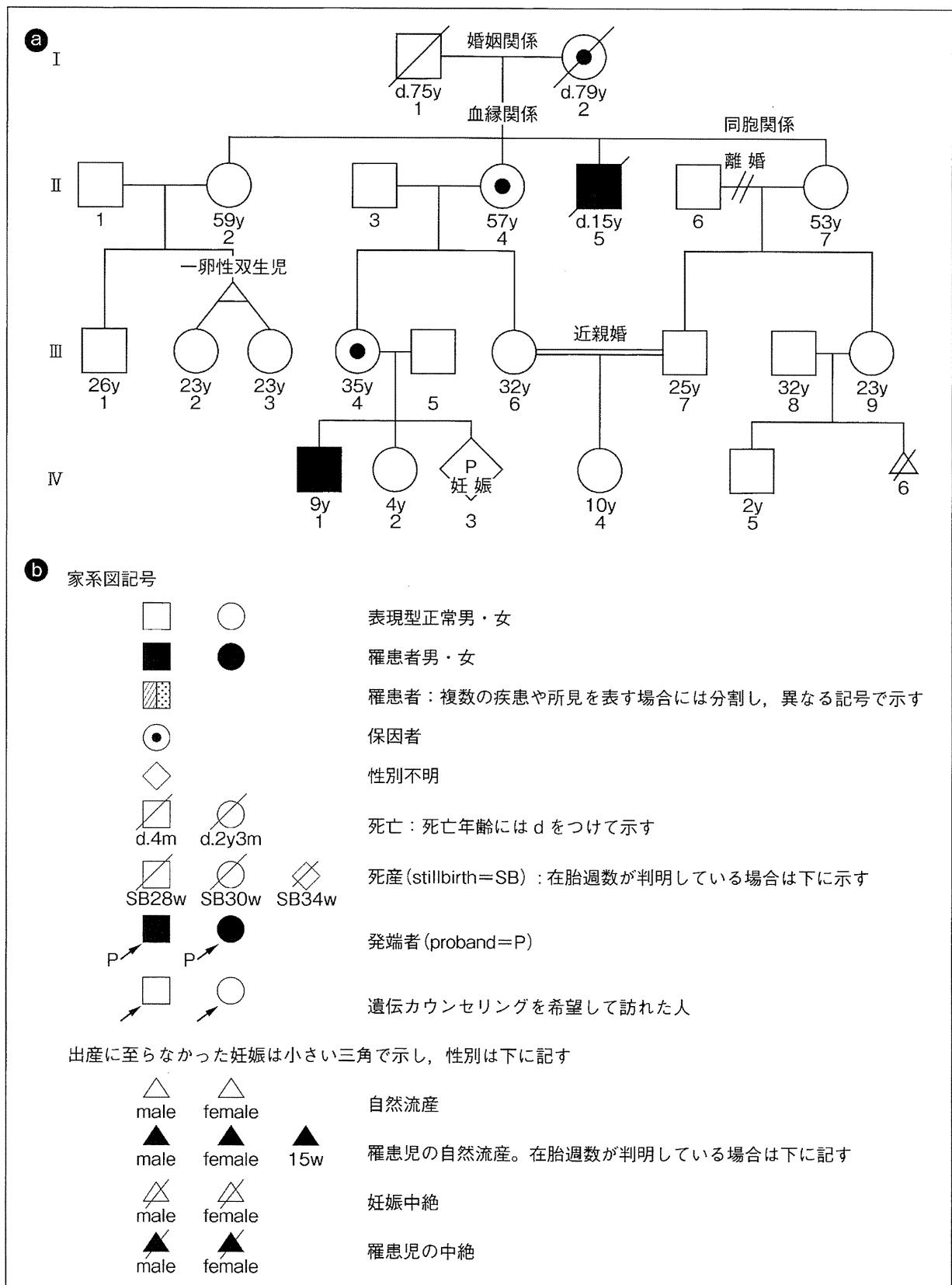


図2

a：家系図の描き方。副腎白質ジストロフィーの例。

b：家系図の記号。

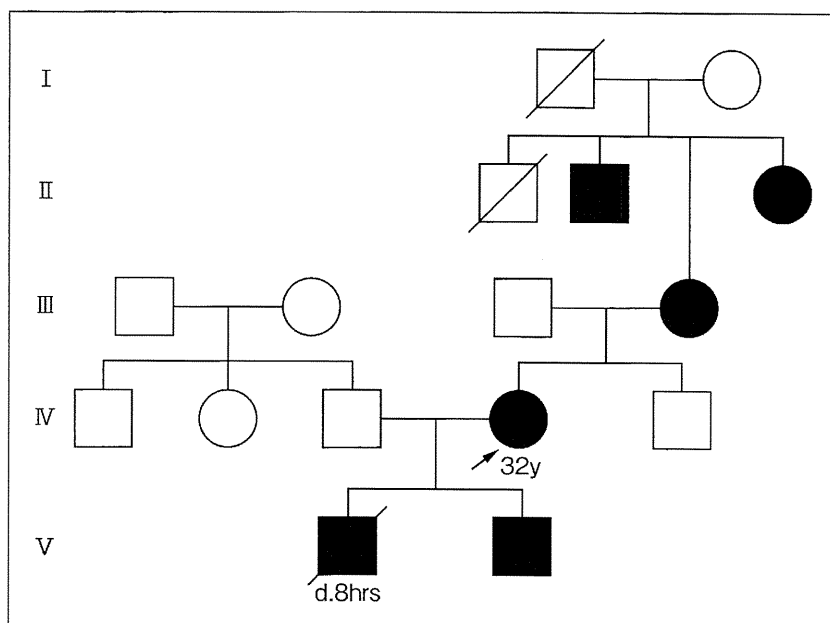


図3 筋強直性ジストロフィーの事例の家系図

遺伝子検査においては、実施前に十分なインフォームドコンセントを行う。発端者の遺伝子検査により確定診断がつき、療育や治療の方針が決まる。遺伝子変異が明らかになったことは家族もその変異を共有することになる。保因者診断や出生前診断の実施が可能になる。遺伝子検査の結果が出た後、フォローアップと心のケアといった心理社会的支援を必要とする場合も多い。

### 3 遺伝カウンセリングの事例

東京女子医科大学附属遺伝子医療センターにおける遺伝カウンセリングの事例を示す。

#### 1. 筋強直性ジストロフィー (DM1)

クライアントは32歳女性。家系図を図3に示す。28歳で第1子を妊娠した。妊娠33週で羊水過多を他院の産婦人科医師に指摘され、羊水検査にて染色体異常はなく、原因はわからないと言われた。35週で破水、産婦人科医院にて緊急帝王切開で男児が出生した。児は出生時から仮死があり、呼吸不全、他病院に緊急搬送され挿管呼吸管理を受けたが8時間後に死亡した。2年後にクライアントは把握時の筋強直、歩行開始時にスムーズに一步が踏み出せないことに気づき、当センターを紹介受診され、遺伝子検査にてDM1と診断した。第1子は先天型

DM1だったと考えられた。クライアントは自身の遺伝子検査後、次子の妊娠を希望しているが、次子が先天型DM1に罹患していたら中絶したいとの考えを述べた。遺伝カウンセリングにおいて、妊娠中からの十分なフォローが必要なこと、出産希望の場合にはNICUのあるスタッフと設備が整った病院ですることなどの情報を提供した。先天型DM1の場合、児は出生時に呼吸器のサポートが必要なほど重症でも、生後の運動発達は他の先天型筋ジストロフィーより良好なことも多いことを話した。さらに、母親がDM1で、その児がDM1に罹患している場合、表現促進現象によって母親より重症になる可能性が高いこと、第1子が先天型DM1で次子も罹患している場合には、次子も同様に先天型となり、成人型とはならない可能性が高いことを説明した。その後、第2子の妊娠6週に来院した。出生前診断の希望の意志は変わらず、学内倫理委員会の承認のもと、妊娠12週に絨毛膜穿刺を施行。出生前診断の結果、児のDMPK遺伝子のCTGリポートは1270と伸長していた。

遺伝子診断の結果開示後、夫婦で話し合い、出産することを決定した。妊娠中、原疾患については臨床遺伝専門医が、心理面については臨

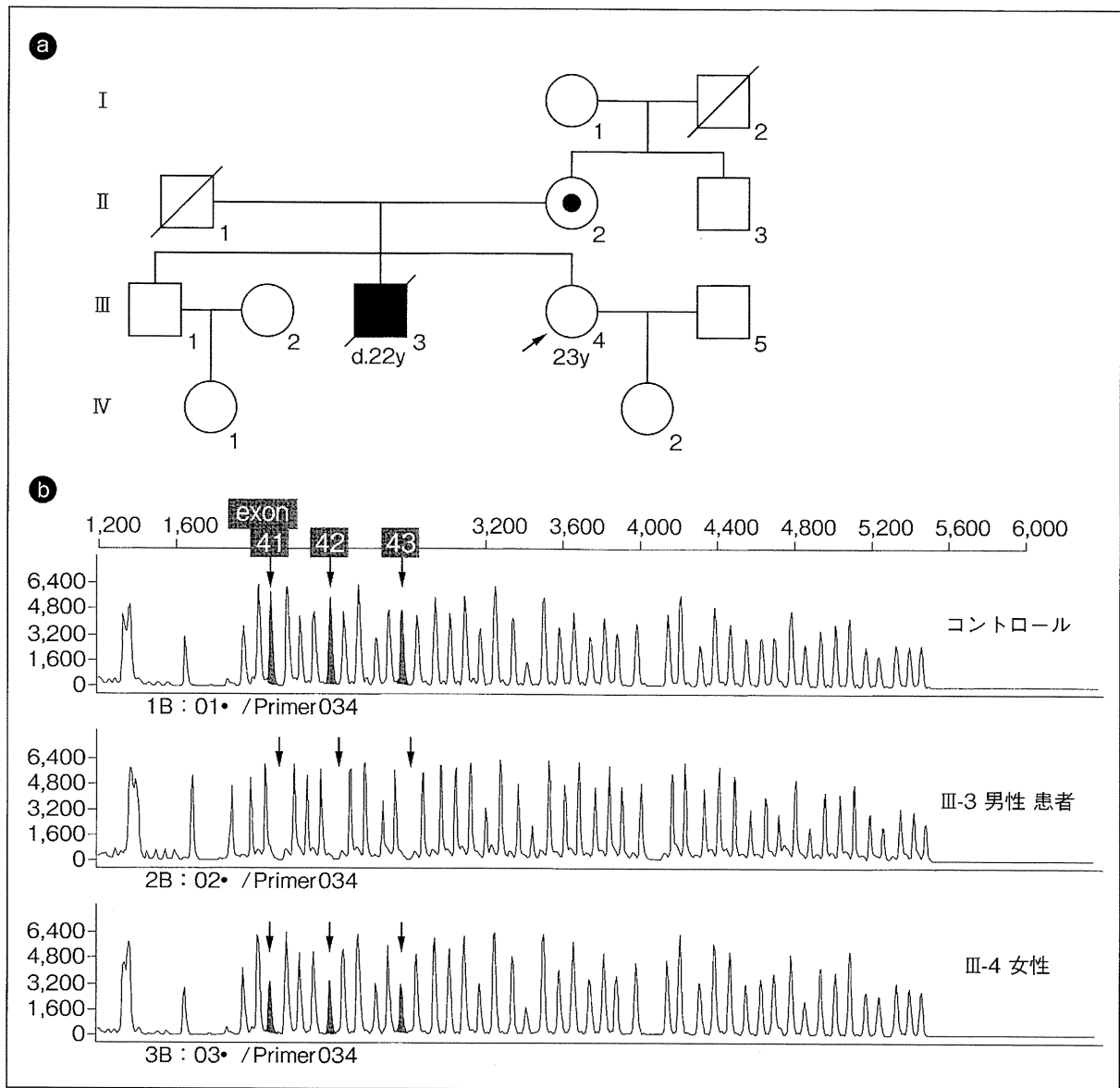


図4

a : Duchenne 型筋ジストロフィーの事例の家系図。

b : Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) による DMD 保因者診断。

床心理士が適時フォローを行った。出産に際し、産婦人科、新生児科と連携し、母子それぞれにチームとしてかかわった。児は男児で、出生時に全身の筋緊張低下、軽度の呼吸障害、横隔膜の挙上を示したが、生後4日目から経口哺乳可能となった。生後9カ月にて坐位可能、1歳にて立位可能と運動発達の遅滞はあるが成長し、現在、小学生である。

## 2. Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) (図4)

図4aのクライアントの女性(Ⅲ-4)から電

話を受けて第1回の遺伝カウンセリングが始まった。クライアントは23歳。発端者である兄(Ⅲ-3)は22歳で死亡。兄は3歳時に筋生検によりDMDと診断された。Ⅲ-4の女性は第1子の女兒を出産後、自分が保因者であるか心配して遺伝カウンセリング外来を受診した。持参の臨床情報により、疾患の臨床診断を確認し、さらに、Ⅲ-3がDMD遺伝子のエクソン41-43の欠失を示すことも明らかになった。

DMDの家系においては、家系図の分析、臨

床所見（筋萎縮，筋肥大，徒手筋力テスト，深部腱反射など），血清 creatine kinase（CK）値により臨床的に保因者診断が可能な例もある。血清 CK 値は，同一人でも採血の時期や条件によって値に幅があり，血清 CK 値が正常の場合は保因者の判定はできない。Ⅲ-4の女性は血清 CK 値は 120 U/l であり，この値から保因者の判定は困難であった。図 4a のケースでは，multiplex ligation-dependent probe amplification（MLPA）法により，コントロールと面積の比較によって検討をした（図 4b）。保因者では発端者における欠失エクソンが非保因者の 1/2 量となる。本症例（Ⅲ-4）では，Ⅲ-3 が示していた DMD 遺伝子エクソン 41-43 の欠失を示していることが明らかになり，保因者と結論した。このように保因者であると診断をされたケースにおいては，心理的サポートとともに，その女性の妊娠において，遺伝カウンセリングを通して，できる限りの援助を行うことを話し，疾患を持って生まれた場合の子どものケア，サポート体制についても説明する。患者会などの情報もクライアントの自己決定に役立つ。また，近年の DMD の治療研究の進歩の情報も提供する。出生前診断に関する情報として，絨毛穿刺，羊水穿刺による診断，着床前診断について解説し，検査を受ける時期，検査の結果が陽性（罹患）であったときの対応，その女性の自己決定をサポートしていくことなどについて十分な説明をして話し合うことが重要である。

#### 4 遺伝カウンセリングの費用

筋ジストロフィーでは，Duchenne 型と福山型の患者における遺伝子検査が 2007 年 4 月から保険診療の対象として認められるようになった。2008 年 4 月より，「筋ジストロフィーの遺伝病的検査」として算定され，遺伝カウンセリング加算も検査結果の開示に伴って 1 回のみ認められるようになった。しかし，複数回の遺伝カウンセリングは保険適応ではない。自費診療としている場合が多く，早期の保険収載が求められる。

#### 5 検査結果の開示とその後のサポート，フォローアップ

検査によって診断をされたケースにおいては，遺伝カウンセリングを通して，十分な援助を行うことを話し，疾患を持つ子どものケア，サポート体制についても説明する。患者会などの情報，医療社会福祉の情報またはソーシャルワーカーの紹介，療育などの本人への支援情報を提供する。遺伝カウンセリングにおいてクライアントのニーズに，ある程度応えることができて，遺伝性疾患は治療不可能なものが多い。診断的検査や治療に関する進歩の情報を当事者に提供できるように，もし彼らがそれを望むなら，定期的なフォローアップを受けること，連絡をとることを促す。遺伝カウンセリングにおいては，プライバシーの問題も大きく，医療サイドから当事者へ連絡をとることは慎重になるべきであり，連絡方法をあらかじめ確認しておくことも大切である。

#### 6 遺伝カウンセリング実施の資格

疾患の遺伝にかかわる相談，特に患者の家族や血縁者の妊娠や結婚に際しての相談は，従来は主治医が診療の一環として行ってきた。遺伝子医学の進歩は著しく，それらの進歩を反映した内容の遺伝カウンセリングを診療の片手間に行うことは困難であり，不正確な遺伝子医学の情報をもって対応することによって，重大な問題を引き起こすこともありうる。遺伝子医学，臨床遺伝学の専門的知識を持ち，本人および家族の心理社会的支援を行うことができる者が専任として対応することが必要である。このような背景によって，日本人類遺伝学会，日本遺伝カウンセリング学会は医師に対しては 2002 年に「臨床遺伝専門医」制度を，非医師に対しては 2005 年に「認定遺伝カウンセラー」制度を制定している。さらに，遺伝専門の看護師，臨床心理専門職，ソーシャルワーカーなどと協力をして，チーム医療として実施することが望ましい。